



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**INCLUSÃO DO SUBSTRATO DE PLEUROTUS OSTREATUS NA
CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO IN VITRO DO FENO DE
BRAQUIÁRIA.**

RICARDO DA SILVA OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2010**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**INCLUSÃO DO SUBSTRATO DE PLEUROTUS OSTREATUS NA
CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO IN VITRO DO FENO DE
BRAQUIÁRIA.**

Aluno: Ricardo da Silva Oliveira

Orientador: Sergio Lucio Salomon Cabral Filho

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 31/2010

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2010**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

OLIVEIRA, R. S. **INCLUSÃO DO SUBSTRATO DE PLEUROTUS OSTREATUS NA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO IN VITRO DO FENO DE BRAQUIÁRIA**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 53p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservaram para si os direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, RICARDO DA SILVA.

Inclusão do substrato de Pleurotus ostreatus na cinética de fermentação in vitro do feno de braquiária.

Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010.

1. Composição química. 2. Fibra. 3. Produtos “orgânicos”. 4. Tratamento biológico. I. Sergio Lucio Salomon Cabral Filho. Doutor.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**INCLUSÃO DO SUBSTRATO DE PLEUROTUS OSTREATUS NA
CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO IN VITRO DO FENO DE
BRAQUIÁRIA.**

RICARDO DA SILVA OLIVEIRA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADO POR:

**SERGIO LUCIO SALOMON CABRAL FILHO
PROFESSOR - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
(ORIENTADOR)**

**HELDER LOUVANDINI
PROFESSOR – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
(EXAMINADOR INTERNO)**

**ROBERTO GUIMARÃES JÚNIOR
PESQUISADOR – EMBRAPA CERRADOS
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 25/03/2010

.

À minha mestre (mãe) Marta, por todo o incentivo e direcionamento, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram com a superação deste desafio.

Dedico

"O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano será menor."
(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

A Deus por este degrau superado.

À minha mãe, minhas irmãs e minha namorada, pela ajuda e compreensão em mais uma conquista.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Sergio Lucio Salomon Cabral Filho por todo o aprendizado passado e pela orientação.

A Universidade de Brasília, faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária e todos incluídos dentro do projeto.

A EMBRAPA-CERRADOS pela colaboração no empréstimo de materiais e nos conhecimentos passados pelo Dr. Roberto Guimarães Jr.

Ao Laboratório de Nutrição Animal da Fazenda Água Limpa, pela colaboração nas análises laboratoriais.

A eterna amiga Talita de Campos Santos pela imensa ajuda no projeto de pesquisa.

Às agências de fomento CAPES (PROCAD – Novas Fronteiras 2007), CNPQ e FAPDF por viabilizarem a realização da pesquisa.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	4
1.3 REVISÃO DE LITERATURA	5
1.3.1 Fungicultura no Brasil	5
1.3.1.1 Resíduo para a produção de cogumelos	8
1.3.1.2 Deslignificação de Plantas	12
1.3.2 Utilização de resíduos na alimentação animal	12
1.3.3 Método <i>in situ</i> de degradabilidade	13
1.3.4 Técnica <i>in vitro</i> semi-automática de produção de gases	14
1.3.5 Aditivos	15
1.3.6 – Próbióticos e Prebióticos	16
CAPÍTULO 2	18
2.1 RESUMO	18
2.2 ABSTRACT	19
2.3 INTRODUÇÃO	21
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.4.1. Local	22
2.4.2. Animais doadores	22
2.4.3. Tratamentos	22
2.4.4. Ensaio da técnica “ <i>in vitro</i> ” semi-automática de produção de gases	23
2.4.5. Ensaio de degradabilidade “ <i>in vitro</i> ” da matéria seca	27
2.4.6. Determinação da fração protéica degradada no rúmem “ <i>in situ</i> ”	28
2.4.7. Análise bromatológicas	28
2.4.8. Análise dos dados	29
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
2.6 CONCLUSÕES	34
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Organograma de interligação entre as produções.	2
Figura 02	Propagação vegetativa em diferentes meios	9
Figura 03	Substrato para cogumelos antes da inoculação	10
Figura 04	Substrato para crescimento de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	11
Figura 05	Preparação da saliva artificial	24
Figura 06	Estufa 39°C	25
Figura 07	Coleta de líquido Ruminal	26
Figura 08	Mesuração de pressão com o transdutor	27
Figura 09	Curva de produção de gases dos tratamentos com o substrato exaurido de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela da produção de cogumelo por Países de maior produção	6
Tabela 2	Proporção dos alimentos utilizados em cada tratamento, feno (F) e substrato exaurido (SE).	23
Tabela 3	Quantidade dos reagentes utilizados na solução de saliva artificial.	24
Tabela 4	Análise Bromatológica.	29
Tabela 5	Parâmetros do modelo da cinética de fermentação e degradabilidade da matéria seca do feno e do substrato exaurido de <i>Pleurotus ostreatus</i> , em diferentes proporções.	31

RESUMO

INCLUSÃO DO SUBSTRATO DE PLEUROTUS OSTREATUS NA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO IN VITRO DO FENO DE BRAQUIÁRIA.

O cogumelo é um alimento apreciado no mundo inteiro e cada cultura criou sua própria forma de consumo. Segundo Wasser; Weis, 1999. possui cerca de 30% de proteína bruta, sais minerais, ferro, vitaminas B1 e B2, cálcio, fibras, outros elementos essenciais, além de baixo teor de gordura e carboidrato. O cogumelo é um alimento que atende as exigências alimento para o homem, pois em uma pequena área pode-se ter grandes produções, com produtividades médias de 18 a 20 Kg/ m²/ ano. O problema é que para produzir 80g de cogumelo in natura é necessário 100g substrato para crescimento do cogumelo propriamente dito, gerando uma quantidade de resíduo muito grande. O objetivo deste é estudar a inclusão do substrato de *Pleurotus ostreatus* na fermentação “in vitro” de dieta a base de feno de *Brachiária brizantha* para ruminantes, assim como determinar diferenças na produção de gás com diferentes níveis de inclusão. Avaliando a cinética de degradação “in vitro” de dietas à base de feno com diferentes níveis de inclusão de substrato exaurido da produção de *Pleurotus ostreatus*, além de quantificar a proteína degradada no rumem a partir do substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus*. O experimento pela técnica “in vitro” semi-automática de produção de gases foi realizado no Laboratório de Nutrição animal da Fazenda Água Limpa-Fal/UnB. Foram utilizados três bovinos adultos como doadores selecionou-se dois alimentos um padrão e um potencial alimento: O Feno (F) e Substrato Exaurido *Pleurotus ostreatus* (SE) em cinco diferentes tratamentos, 100% (F), como padrão de alimento; 100% (SE), para testar o potencial do material e avaliar a capacidade de inibição ou aumento de produção de gás; (F) + (SE) 5%; (F) + (SE) 20%; (F) + (SE) 30%. O delineamento experimental foi um fatorial 5 X 3 com cinco tratamentos e 3 inóculos (três animaisdoadores). A análise de variância, foi feita pelo PROC GLM do programa estatística SAS (2000). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey (5%). A degradabilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) estimada segundo Theodorou et al. (1994), no tempo pré-determinado de 96 horas. As análise bromatológicas foram: MM, MS, PB, FDN, FDA, EE, FB segundo A.O.A.C. (1990) e VAN SOEST et al. (1991). Para produção total de gases obteve-se o tratamento (F)+(SE)5% a maior quantidade acumulada de gases com uma produção de 284,28 ml de gases ficando 8% acima do (F) 100%, reafirmando a condição de melhora na utilização do Feno pelos microorganismos ruminal.

O substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* apresentou rápida colonização pelos microrganismos do rúmen, além de propiciar uma facilitação na degradação do feno. Os padrões de fermentação foram inferiores ao do feno estudado, mostrando que o resíduo não pode ser utilizado em substituição a um volumoso de boa qualidade, entretanto a inclusão do substrato ao feno não prejudicou a fermentação e poderia ser utilizada como uma alternativa de aproveitamento do resíduo em dietas de ruminantes.

Palavras-chaves: Brachiária brizantha, composição química, fibra, produtos “orgânicos”, tratamento biológico.

2.2 Abstract

Inclusion of substrate of *Pleurotus ostreatus* on kinetics of in vitro fermentation of *Brachiaria hay*

The mushroom is a food enjoyed throughout the world and each culture has created its own form of consumption. According to Wasser; Weis, 1999, it has about 30% crude protein, minerals, iron, vitamins B1 and B2, calcium, fiber, other essential elements, and low in fat and carbohydrate. The mushroom is a food that meets the demands food for man, because in a small area have major productions, a mean yield 18-20 kg / m² / year. The problem is that to produce 80g of fresh mushroom is necessary 100g substrate for growth of the fungus itself, generating a huge amount of waste. The aim of this study is the inclusion of the substrate of *Pleurotus ostreatus* on fermentation in vitro of diet of *Brachiaria brizantha* hay for ruminants, as well as determining differences in gas production with different levels of inclusion. Assessing the degradation kinetics in vitro of diets based on hay with different levels of inclusion of substrate depleted production of *Pleurotus ostreatus*, and quantify the protein degraded in the rumen from the exhausted substrate of *Pleurotus ostreatus*. The experimental technique in vitro semi-automated gas production was conducted at the Laboratory of Animal Nutrition at Agua Limpa-Fal/UnB. Three adult cattle were used as donors was selected two foods a pattern and a potential food: The Hay (F) and substrate Exhausted *Pleurotus ostreatus* (SE) in five different treatments, 100% (F) as the standard of food, 100% (SE), to test the potential of the material and assess the ability of inhibition or increased gas production, (F) + (SE) 5% (F) + (SE) 20% (F) + (SE) 30%. The experiment was a 5 X 3 factorial with five treatments and three inocula (three animalsdoadores). The analysis of variance was performed by PROC GLM of SAS statistical program (2000). Means were compared by Tukey test (5%). The in vitro degradability of dry matter (DM) estimated according to Theodorou et al. (1994), the predetermined time of 96 hours. The chemical analysis were: MM, MS, CP, NDF, ADF, EE, CF by AOAC (1990) and VAN SOEST et al. (1991). For total gas production was obtained when the treatment (F) + (SE) 5% as much total gas with a production of 284.28 ml of gas going up 8% (F) 100%, reaffirming the status of improve the use of hay by rumen microorganisms. The exhausted substrate of *Pleurotus ostreatus* showed rapid colonization by microorganisms in the rumen, in addition to providing a facilitation in the degradation of hay.

The patterns of fermentation were lower than hay studied, showing that the waste can not be used instead of a bulky good quality, however the inclusion of the substrate did not impair the hay fermentation and could be used as an alternative use of waste in diets of ruminants.

Key Words: biological treatment, *Brachiaria brizantha*, chemical composition, fiber, “organic” products.

1 CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

O cogumelo é um alimento apreciado no mundo inteiro e cada cultura criou sua própria forma de consumo. Seja in natura, em conserva ou desidratado. Os Países Europeus e os Orientais são os maiores consumidores deste produto, o cogumelo Shimejii (*Pleurotus ostreatus*) é um dos mais consumidos mundialmente.

Segundo Wasser; Weis, 1999. esse alimento possui cerca de 30% de proteína bruta, além de conter sais minerais, ferro, vitaminas B1 e B2, cálcio, fibras, outros elementos essenciais, além de baixo teor de gordura e carboidrato.

O homem alimenta-se de cogumelos desde o primórdio da espécie, para alguns grupos em especial era uma rica fonte de proteína. Em alguns casos, toxinas de cogumelos venenosos eram usadas em instrumentos perfurocortantes para aumentar a dor nas feridas ou matar possíveis predadores.

A partir da década 1970 começou todo avanço tecnológico, observa-se um aumento de produção principalmente nos cogumelos ditos “medicinais” e nutracêuticos, podemos citar como exemplo derivados de Trametes, Ganoderma, Lentinus, Schizophyllum entre outros (Bononi ; Gimens. 2008).

A produção de alimento é constantemente forçada pelo aumento da demanda de fornecimento para a população humana. As áreas cultiváveis, cada vez mais, sofrem pressões de ONG's e da população para a não expansão de fronteiras agrícolas para áreas de vegetação nativa, devido a esses fatores a procura por alimentos que substituam e /ou intensifiquem a quantidade de alimento, estão em constante desenvolvimento

O cogumelo é um alimento que atende a essas exigências, pois em uma pequena área podemos ter grandes produções, com produtividades médias de 18 a 20 Kg/ m²/ ano. O problema é que para produzir 80g de cogumelo *in natura* é necessário 100g substrato, o que gera uma quantidade de resíduo muito grande. Atualmente esse resíduo é usado como húmus, mas tem potencial para ser utilizado na produção animal.

A integração de cadeias produtivas existentes inserindo subprodutos de um tipo de produção em outra, pode baratear o processo com a inserção de novos componentes, diminuindo o resíduo descartado na natureza e gerando sustentabilidade aos sistemas. Segundo Gern et al. 2008. a escolha de resíduos, deve ser baseada na disponibilidade e quantidade necessária, na localidade, do resíduo gerando uma sustentabilidade para a produção.

Em referência ao organograma abaixo, toda a produção tem como objetivo o atendimento de uma necessidade humana.

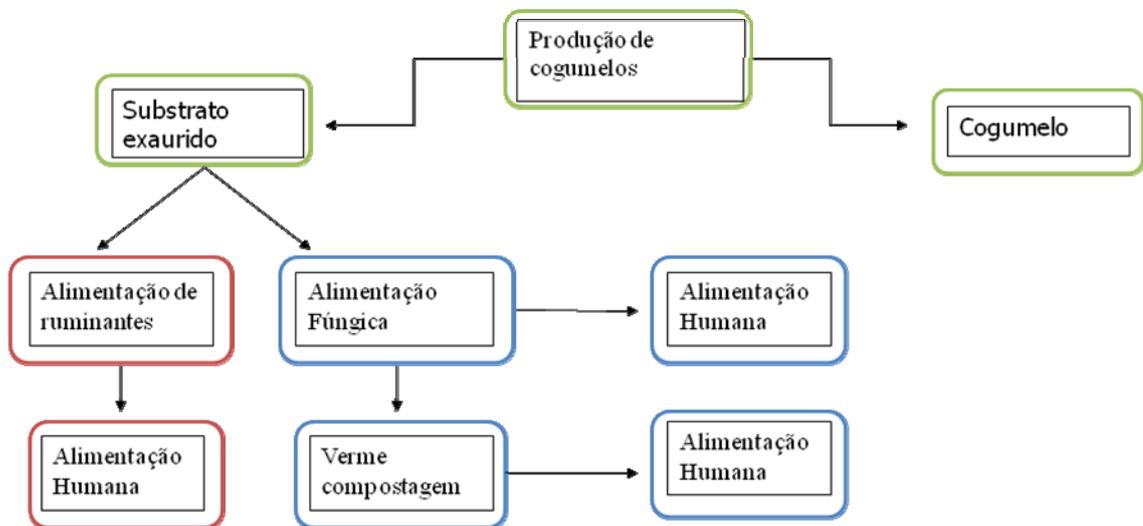


Figura.01 Organograma da possível interligação entre as produções

A produção de *Pleurotus ostreatus* gera dois produtos: O cogumelo (consumo humano) e o substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* (consumo animal e ou fúngico). A produção de ruminantes gera alimento e outros produtos em benefício para o homem

O substrato utilizado na primeira produção pode ser utilizado, em uma determinada proporção, para inclusão no composto para fungos de segunda ordem. Análises químicas do substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus*, mostraram que a degradação exercida pela ação enzimática gera um material com características próximas aos dos desejáveis para o cultivo de *Agaricus* (Gern et al. 2008.), ou então, a primeira produção de fungos de primeira ordem lignocelulolíticos (*Pleurotus ostreatus*), fornecendo o substrato exaurido. Segundo Schmidt (2002) esses basidiomicetos degradam enzimaticamente o substrato, solubilizando carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina, CO² e água do substrato para utilizá-los em seu metabolismo, gerando assim o resíduo na alimentação animal. Quando este composto ficar inutilizado, é possível a realização uma compostagem e uma vermecompostagem produzindo húmus e minhoca.

Para sabermos o real benefício do substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* é necessário a realização de ensaios “*in vitro*” e após a comprovação de que não prejudica a microbiota ruminal, ensaios “*in vivo*” poderão ser realizados.

A realização de ensaio pode ser realizada pela técnica “*in vitro*” semi-automática de produção de gases correlacionada com a técnica de degradabilidade da matéria seca, a qual se baseia na simulação da fermentação ruminal em frascos para mensuração da quantidade de gás produzido por um determinado tempo.

Várias pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de aumentar a disponibilidade nutricional e degradabilidade de diferentes tipos de resíduos lignocelulósicos, mediante tratamentos físicos, químicos e biológicos.

Com a utilização fúngica espera-se uma maior produção de gás, pois entende-se que o material já sofreu ação enzimática, ocorrendo assim a biodiponibilização da matéria. Zandrazil (1977) constatou aumento em 12% na digestibilidade “*in vitro*” da palhada de trigo incubada com *Pleurotus sp.*

1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é estudar a inclusão do substrato de *Pleurotus ostreatus* na fermentação in vitro de dieta a base de feno de *Brachiária brizantha* para ruminantes, assim como determinar diferenças na produção de gás com diferentes níveis de inclusão. Como objetivo específico tem-se:

- Avaliar a cinética de degradação in vitro de dietas à base de feno com diferentes níveis de inclusão de substrato exaurido da produção de *Pleurotus ostreatus*.
- Quantificar a proteína degradada no rumem a partir do substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus*.

1.3. REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Fungicultura no Brasil e no Mundo

O homem desde a antiguidade alimenta-se de cogumelos, utilizava-se da coleta na natureza, posteriormente com muita observação e tentativas o homem começou a domesticar algumas espécies comestíveis, cultivando-as de forma artificial, essa busca ocorre até os dias de hoje com novas espécies. (Zhanxi e Zhanhua, 1995, 1996).

Segundo Van Griensven, 1987. o primeiro isolamento miceliar pura foi em 1894 pelos franceses J. N. Constantin e L. Matruchot os quais conseguiram obter micélio puro pela multiplicação de esporos em condições assépticas. O primeiro relato na China da técnica da cultura do micélio puro ocorreu em 1930, resultando em um aumento de vigor e a possibilidade de controlar doenças, além da seleção de cepas para comercialização (Zhanxi & Zhanhua, 1995).

No Brasil iniciam-se as primeiras pesquisas na década de 40 pelo Instituto Biológico de São Paulo (Dirigente Rural, 1970), mas a produção de cogumelos começou na década de 50, com o enfraquecimento da avicultura por causa da crise alguns produtores trocam o frango pelo cogumelo (Molena, 1986), mas o ramo ganhou força com a vinda de imigrantes chineses para o Brasil, na década de 60.

A produção do Brasil ainda é muito pequena em relação aos países de maior produção no mundo, na tabela abaixo pode-se avaliar o potencial da quantidade de utilização do substrato exaurido produzido, pois para cada 800kg de cogumelo *in natura* produzido é necessário 1000Kg de substrato.

A China, maior produtora mundial, produz cerca de 1.882.227,60 Kg de substrato por ano, com potencial para ser utilizado como alimento para grandes e pequenos ruminantes.

Tabela. 01: Tabela da produção de cogumelo por Países de maior produção

Rank	Área	Produção (MT)
1	China	1.568.523
2	Estados Unidos	359.630
3	Holanda	240.000
4	Polônia	180.000
5	França	162.450
6	Espanha	140.000
7	Itália	85.911
8	Canáda	81.610
9	Irlanda	75.000
10	Reino Unido	72.000
11	Japão	67.000
12	Alemanha	55.000
13	Indonésia	48.247
14	Bélgica	43.000
15	Austrália	42.739
16	Korea	28.764
17	Iran	28.000
18	Hungria	21.200
19	Vietnan	18.000
20	Índia	16.000
37	Brasil	10.000

Fonte:FAO 2007

A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), em 2007, estimou uma produção de cogumelos em cerca de 3.33 milhões de toneladas, destaque para a China como maior produtora, em média 1.5 milhão de toneladas ao ano. Em segundo lugar está os Estados Unidos da América com uma produção de 359 mil toneladas ao ano.

De 1968 até 2007, o consumo anual no Brasil aumentou de 20 toneladas para 10 mil toneladas. Apesar desse avanço, o consumo *per capita* no país ainda é de apenas 50 g por ano, contra 2,1 kg na França e 1,4 kg na Itália. Cerca de 60% da produção nacional é consumida *in natura* e os 40% restantes são absorvidos pela indústria de conservas (Campos, 1990). De acordo com os números acima, constata-se que, o consumo no Brasil ainda é seletivo, pois a maior parte da população desconhece e ou pouco utiliza os cogumelos na sua alimentação.

Na alimentação humana, os cogumelos são fontes de proteínas utilizadas principalmente por pessoas que possuem como hábito de vida a não ingestão de carne. Na

indústria é utilizado para produção de enzimas, cosméticos e remédios, substâncias anti-tumores e antibióticos, (Chang & Miles, 1984; Mizuno *et al.* 1992).

Os macromicetos também chamados de cogumelos são assim designados por sua característica de gerar corpo de frutificação e produção de esporos. Os macromicetos representam cerca de 4% de todas as espécies de fungos, cerca de 10.000, podendo ser venenosos, alucinógenos, comestíveis e ou medicinais. Entretanto sabe-se que 2.000 espécies de fungos são comestíveis, destes apenas seis espécies são comercializados em escala comercial no mundo (Chang, 1991). Segundo Kendrick (1992) a ordem mais cultivada do mundo é a Agaricales, na qual estão incluso o *Agaricus bisporus* “Champignon de Paris”, *Lentinula edodes* “Shiitake”, *Pleurotus ostreatus* “Cogumelo Ostra”.

Existem relatos de cultivos desde a antiguidade na China do *Ganoderma lucidum* (2.000 anos) também conhecido como cogumelo Rei, era consumido pela nobreza chinesa assim como o *Poria cocos* (400-500 a.C.).

A cronologia de Produção na China ocorreu da seguinte forma, em 1960 a inoculação com micélio puro foi introduzida no cultivo. Na Década de 70 inicio-se o cultivo axênico com serragem e demais constituintes das formulações. Em 80 inicio-se a técnica chamada de “Jun Cao” agregando benefícios sociais (maior facilidade de produção), ecológicos (utilização de capim no lugar de madeira) e econômicos (barateamento da produção), unindo a produção a um ciclo ecológico entre plantas, animais e fungos (Zhanxi e Zhanhua, 1995). Em 1990, a China se tornou o maior produtor de cogumelos, gerando empregos e ajudando o desenvolvimento de diversas cidades (Zhanxi & Zhanhua, 1995).

1.3.1.1 Resíduo da produção de cogumelos

A produção de cogumelos pode ser realizada com diferentes metodologias para várias espécies. O cultivo em toras demanda mais tempo e instalações maiores, a colheita só é iniciada entre o 6º mês e o 12º mês. Pelo método axênico, produzido em serragens, este tempo é reduzido para 150 dias. O cultivo de *Ganoderma lucidum* com serragem de ameixeira (*Prunus domestica*), pode ser enriquecido com resíduos orgânicos, tais como: casca de caroço de algodão (*Gossypium hirsutum*), bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), pupunha (*Bactris gasipaes*), fava dantas (*Dimorphandra mollis*), jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e gramíneas: brachiária (*B. decumbens* e *B. brisantha*), capim elefante (*Pennisetum purpureum*), andropogon (*Andropogon sp.*) e tífton (*Cynodon sp.*).

A técnica mais nova de produção de cogumelos é a “JUN CAO”, que em português significa “capim no saco”, na qual o tempo de produção é reduzido para 60 a 90 dias. Na etapa vegetativa, crescimento miceliar, utiliza-se grãos de sorgo, trigo ou milho para produção de sementes. A figura abaixo demonstra várias etapas de produção: Em placa de petri o isolamento a partir do cogumelo; Nas sementes o micélio mais vigoroso pronto para colonizar o substrato.



Figura 02: Propagação vegetativa em diferentes meios. Foto: Embrapa CENARGEM.

Existem várias formulações para a produção de cogumelos, o substrato utilizado foi sedido pela Empresa Cultivis Cogumelos Comestíveis, graduada pelo processo de incubação do UniCEUB, com tecnologia EMBRAPA / CENARGEM, para a produção do mesmo. A formulação é a base de 78% de capim (Brachiária); 20% de farelo de trigo; 2% de gesso para crescimento de frutificação, cogumelo propriamente dito.

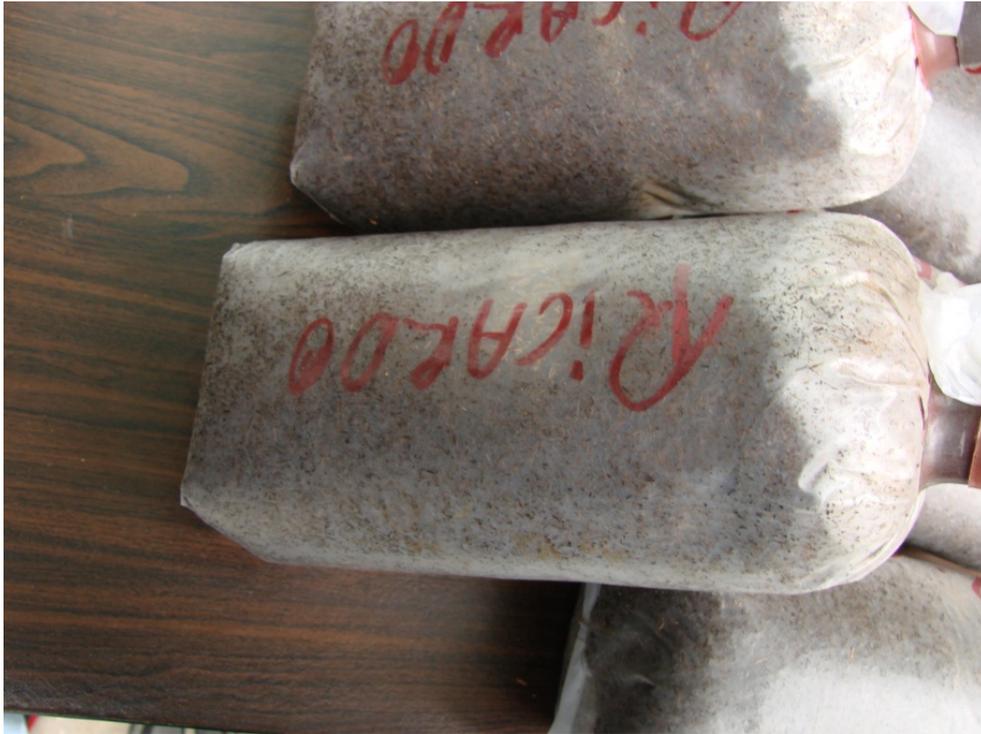


Figura 03: Substrato para cogumelos antes da inoculação. Foto: Ricardo da Silva Oliveira

Os basidiomicetos destacam-se pela capacidade de biodegradar a matéria orgânica, dentre estes, os fungos do gênero *Pleurotus*, destacam-se pelo seu alto valor nutricional e fácil propagação além de serem pouco exigentes quanto ao clima e a matéria a ser degradada.

Segundo Platt et al. (1984), alguns *Pleurotus* possuem entre outras enzimas: celulase, celobiase, hemicelulase, ligninase e lacase. A lacase, uma fenoloxidase responsável pela degradação da lignina fenólica e não-fenólica, produzindo ácidos aromáticos (Buswell & Odier, 1987). Atuando na reciclagem de resíduos agrícolas e agroindústrias como esterco bovino, equino, de aves, suínos, palhas e outros resíduos: de trigo, arroz, milho, sorgo, algodão, cana, madeira, etc., que são adequados para a biotransformação, convertendo a biomassa lignocelulósica em alimentos nutritivos.

Atualmente as destinações finais de resíduos orgânicos agrícolas não cumprem o ciclo natural de decomposição. Tais resíduos são dispostos de maneira inadequada gerando, na maioria das vezes, problemas no solo, cursos d'água e ar. A crescente demanda por alimento gera pressão sobre as áreas de florestas, expansão das fronteiras agrícolas, acarretando na multiplicação dos problemas ambientais.

Ao observar essa problemática conclui-se que a melhor forma de processar esses recursos está na própria natureza, pois o favorecimento do crescimento fungico é só uma adequação à biomassa produzida, segundo Schmidt et al. (2003) os tratamentos biológicos têm como finalidade a utilização de microorganismos (bactérias e fungos) que atuam na porção menos degradável do substrato, preferencialmente a lignina, sem provocar perdas consideráveis de celulose e hemicelulose. São ambientalmente seguros, por não usarem substâncias químicas durante o processo, além de ter um acesso na produção de "alimento orgânico", pois assim gera-se mais alimento para a população humana, dando um destino "ambientalmente correto" aos resíduos agroindustriais e reincorporando o resíduo gerado na produção animal, como alimentação para ruminantes ou como alimento para vermes decompositores (minhoca) formando o húmus.

A figura abaixo mostra um cogumelo shimejii (*Pleurotus ostreatus*) da forma que é produzido.



Figura 04: Substrato para crescimento de *Pleurotus ostreatus*. Foto: Ricardo da Silva Oliveira

1.3.1.2 Deslignificação de Plantas

Na natureza tem-se como principais decompositores fungos saprófitas e bactérias específicas e por sua capacidade de degradar a parede celular lignificada são únicos, mas algumas espécies são de especial interesse, pois podem utilizar de forma seletiva a lignina da madeira sem degradar a celulose e hemicelulose.

A lignina é um complexo estrutural heterogêneo de fenilpropanóide essa substância confere sustentação e rigidez à parede celular (Kirk et al 1971; Sarkanen 1971). Ela se liga intimamente com a hemicelulose e a celulose (Kerr, 1975; Kirk 1987), fornecendo assim uma barreira física e química à biodegradação. Embora a maioria dos fungos saprófitas consiga alguma degradação da madeira, por possuírem enzimas como celulase e hemicelulase, não conseguem degradar esse tipo de substrato eficientemente.

Observações de processos de decomposição na natureza tem habitualmente considerado a lignina um dos últimos componentes a ser degradado (Barbour, 1987; Melillo, 1982). A matriz de lignina, quimicamente modificada, é gradatamente transformada em húmus por outros microorganismos (Eriksson, 1990; Ertel et al. 1995; Rayner, 1988).

A dinâmica ecológica de deslignificação seletiva pode resultar em uma utilização da celulose junto com todos os carboidratos da parede celular, ou a lignina pode ser removida, preferencialmente, com pouca ou nenhuma perda de celulose.

Moreira Neto (2006) Quando a lignina é retirada de forma seletiva uma grande concentração de celulose permanece favorecendo e facilitando assim a utilização. Com isso podemos estreitar e interligar a utilização dos resíduos de produção fúngica na alimentação animal. (Schmidt; Weschsler; Nascimento, 2003). Kamida et al., 2005

1.3.2 Utilização de resíduos na alimentação animal

As necessidades nutricionais dos animais variam de acordo com a fisiologia e o estágio de desenvolvimento de cada raça, além de dependerem também de condições ambientais e do objetivo que se pretende atingir, por exemplo, corte, recria, produção de leite, ovos e etc. (ANDRIGUETO et al., 1983).

Os descartes de materiais potencialmente comestíveis vêm sendo cada vez mais utilizados, seja pela necessidade do produtor em reduzir custos, ter um diferencial no produto com apelo ao (ambientalmente correto) ou por incentivo do governo (local e/ou internacional) como exemplo “crédito carbono”.

A conciliação entre a área produtiva e área de preservação ambiental, tem que partir do produtor, segundo Jacobi (1998), preconiza que a educação e o respeito pelo meio ambiente assumem um papel de transformação, na qual o homem é co-responsável para a instalação de um novo meio com um desenvolvimento sustentável, essa idéia foi lançada em 1987 com a divulgação do relatório de Brundtlandt, indicando uma inflexão sobre os impactos do desenvolvimento.

Este relatório demonstra as necessárias relações entre economia, tecnologia, sociedade e política, interligando com a real necessidade de uma nova postura ética em relação à preservação do meio ambiente, intrínseca em cada ser vivo.

A sustentabilidade da produção começa em uma linha raciocínio voltado para a natureza (diminuição do uso de recursos naturais) objetivando-se o lucro, portanto quanto mais subprodutos forem inseridos na alimentação animal, em substituição aos produtos que são diretamente ligados à alimentação humana, mais barato será o custo do produtor e maior será a oferta de alimentos para a população humana.

1.3.3 Método *in situ* de degradabilidade

A técnica da degradabilidade *in situ* foi desenvolvida por (Mehrez e Orskov, 1977), e consiste em colocar sacos de náilon porosos não degradáveis, com amostras de alimentos, no rúmen de um animal fistulado, possibilitando a determinação da porção degradável do mesmo, como a matéria seca (MS) e proteína bruta (PB), etc. Possibilitando a comparação qualitativa de diferentes alimentos. A metodologia é adotada pelo AFRC (1992) como padrão para a caracterização da degradabilidade ruminal da proteína de alimentos, pelo fato de fornecer as melhores comparações com os resultados *in vivo*. Por se tratar de uma técnica simples, rápida e econômica, seu uso é de ampla aceitação. Orskov et al. (1980) relata a necessidade de alteração no tempo, de acordo com natureza do alimento, pois alimentos concentrados e volumosos tem taxa de passagens diferentes no rúmen. Com isso a incubação deve ser em função do material testado. Alimentos tratados ou não quimicamente impõem a necessidade de conferir se os métodos tradicionais são adequados, uma vez que o método não foi desenvolvido para alimento processados química ou fisicamente.

A pecuária brasileira apresenta com base na alimentação as pastagens devido ao seu baixo custo de formação em relação aos grãos, mas o crescimento o ganho de peso do

animal está diretamente relacionado à quantidade de nutrientes e a biodisponibilidade desses nutrientes, os quais são necessários para atender a exigência do animal (Gomide, 1993).

Em períodos de seca ocorre a queda do valor nutricional das forragens, pois estas ficam mais lignificadas dificultando a degradabilidade e conseqüentemente perda de desempenho animal.

Dentre a composição das forragens temos a proteína bruta que inclui o nitrogênio protéico, que pode representar até 70% da PB nas forragens jovens (Heath et al., 1985) e o não protéico.

O material que mais dificulta de degradabilidade é a lignina, pois sem ela teoricamente todos os nutrientes poderiam ser totalmente aproveitados. Os complexos lignocelulolíticos e lignohemicelulolíticos dificultam a degradação da fibra.

Segundo Van Soest (1994), a fibra em detergente neutro (FDN) é o componente da forragem mais consistentemente associado ao consumo.

1.3.4 Técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases

Existem vários métodos para a avaliação de um alimento o ensaio *in vivo* na produção animal e digestibilidade são os métodos mais adequados para determinar o valor nutricional dos alimentos utilizado na nutrição dos ruminantes. Entretanto, os mesmos requerem considerável uso de animais, alimentos, mão-de-obra, tempo e alto custo financeiro, limitando assim a sua aplicabilidade. Como conseqüência, várias técnicas *in vitro* vêm sendo utilizadas como opção, pois é de baixo custo e rápida execução. Porém, as técnicas *in vitro*, para que tenham credibilidade, precisam ser validadas por meio de experimentos realizados *in vivo*. A técnica de produção de gases desenvolvida por Theodorou et al. (1994) caracteriza-se pela leitura manual do volume de gases produzidos através de uma seringa plástica graduada. O uso da seringa restringe o número de amostras analisadas por experimento, diminui o número de leituras e conseqüentemente compromete descrição da curva de fermentação principalmente durante o período inicial de fermentação (lag-phase) e muitas vezes comprometem a acurácia das leituras devido a erros cometidos pelo operador. A técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases (Mauricio et al., 1999) apresenta comprovado potencial em descrever a cinética da fermentação no rúmen, fornecer a taxa e a extensão da degradação das forrageiras (Getachew et al., 1998), bem como medir produtos da fermentação de partes solúveis e insolúveis de substratos (Pell & Schofield, 1993). Essa técnica permite avaliar grande número de substratos por experimento, apresentando alta acurácia nas

medições, simplicidade no manuseio de equipamentos e baixo custo na implantação e por amostra analisada.

A cinética de fermentação é avaliada de acordo com o volume de gás produzido durante a fermentação de substratos através da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases (RPT) permite avaliar a cinética de fermentação de alimentos utilizados na nutrição de ruminantes, enquanto a degradação da matéria seca (DMS) permite avaliar o desaparecimento diretamente da fermentação dos substratos, liberando ácidos graxos voláteis (AGVs) ou indiretamente por uma reação de neutralização dos AGVs com os tampões (Wolin, 1960). A detreminação dos gases é originado pelo tipo de composição do alimento, a maioria dos gases é liberada pela fermentação de carboidratos, seguidos por menor volume de gases liberados pelas proteínas e nenhuma quantidade liberada pelos lipídeos. Além disso, outras alterações podem ser causadas pela fermentação da fibra (maior produção de gases) e do amido (menor produção de gases). O volume dos gases produzidos por unidade de substrato degradado não é constante. Dessa forma, os valores de produção de gases (PG) devem ser obtidos simultaneamente com a DMS, visando fornecer critérios suficientes para a avaliação de alimentos (Mould, 2003). Alguns sistemas de modelagem foram utilizados com a finalidade de associar as curvas de PG com a produção de AGVs e assim, obter a degradação da matéria orgânica. A aplicação de sistemas matemáticos permite a interpretação dos dados “brutos”. A utilização de técnicas de produção de gases das quais os dados de PG podem ser obtidos simultaneamente com a degradação da matéria seca DMS constitui uma opção viável para a solução desses problemas (Mould, 2003). A quantidade de material incubado (um grama) e o grande número de frascos que podem ser utilizados na técnica de PG descrita por Maurício et al. (1999) permitem avaliar a DMS e alternativamente avaliar o resíduo da fermentação, tais como fibra Detergente Neutra FDN, fibra Detergente Ácida FDA, proteínas e outros. Dessa forma, as demais técnicas que utilizam pequenas quantidades de amostras não permitem a avaliação do resíduo (Menke et al., 1979; Blümmel e Ørskov, 1993).

1.3.5 - Aditivos

Os ionóforos são antibióticos carboxílicos poliéteres, agem deprimindo e ou inibindo o crescimento de microorganismos patogênicos e não patogênicos, inicialmente eram utilizados como agentes coccidiostáticos, na ração para frangos posteriormente empregados na melhoria de eficiência alimentar em ruminantes (ROLLINSON et al. 1987).

A depressão ou inibição dependem da permeabilidade do invólucro celular, as bactérias gram-positivas responsáveis pela formação de ácido acético, butírico, fórmico e hidrogênio são mais inibidas que as gram-negativas por monesina e outros ionóforos parecidos. Protozoários e fungos também são sensíveis aos ionóforos (Wallace, 1994).

Segundo Nicodemo (2001), o foco da estabilização ruminal tem como objetivo aumentar a formação de ácido propiônico, diminuir a produção de metano, a redução da proteólise e desaminação da proteína dietética no rúmen e que alguns aditivos podem promover parte desses efeitos.

Os antibióticos, ionóforos por natureza, são fornecidos aos bovinos em terminação para o controle do abscesso de fígado, eles também evitam o crescimento de microorganismos nocivos no trato gastrointestinal (Nicodemo, 2001). Também podem diminuir o timpanismo, mas existem ainda poucos dados.

Bergen e Bates (1984) relatam a ação biológica dos ionóforos aos bovinos são: O aumento da eficiência do metabolismo energético das bactérias do rúmen; aumento do metabolismo de nitrogênio das bactérias ruminais; Diminuição das desordens digestivas resultantes da fermentação ruminal anormal.

As leveduras, *Sacchariomyces*, têm sido utilizada como suplemento alimentar há vários anos. Existem indicações de que aditivos microbianos podem melhorar a produção de ruminantes, próximo aos níveis dos ionóforos, em cerca de 7% a 8%. (Martin & Nisbet, 1992; Wallace, 1994). O composto suplementado ao animal possui o alimento para o crescimento do fungo e este por sua vez disponibiliza enzimas, minerais e fatores de crescimento para as bactérias (Wu, 1997).

1.3.6 – Próbioticos e Prébioticos

Dentre os benefícios requeridos pelos nutricionistas animal estão as características supra citados, além dos aditivos, existe outro grupo descrito como: Substâncias alimentares polissacarídeos não amido e oligossacarídeos, que nutrem um grupo seletivo de microorganismos, favorecendo-os que são benéficos aos ruminantes, também conhecido como prébioticos. Diferente dos antibióticos, esses alimentos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos através da nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (Sanders, 1998).

O probiótico é um suplemento alimentar que contém microorganismos vivos (Mota *et al.*, 2006), são inócuos e não transportam genes transmissores de resistência a antibióticos (Holzapfel e Schillinger, 2002). Yoon e Stern (1995) caracterizam-as como culturas microbianas viáveis, extratos de culturas, preparações enzimáticas de bactérias, fungos e leveduras. São utilizados como promotores de crescimento, (Coppola e Turnes, 2004), elevam a digestibilidade e eficiência de utilização dos alimentos (Nicodemo, 2001), além disso, aumenta a resposta imune humoral nos bovinos (Arenas *et al.*, 2005).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* sp. são tradicionalmente utilizada na fermentação do álcool e açúcar. As fornecedoras de leveduras empregadas na nutrição animal são basicamente destilarias e cervejarias, no qual recuperam as leveduras de seus processos fermentativos por centrifugação. Após estarem secas e moídas são destinadas à suplementação animal (BERTO, 1985).

A utilização de leveduras ainda não é um processo concreto alguns estudos relatam aumentos expressivos, em ganho de peso e produção de leite (Beeson e Perry, 1952), em outros estudos relatam pouco ou nenhum aumento de produção (Newbold, 1995).

O efeito encontrado com a adição de culturas de leveduras em dietas de ruminantes é maior estabilidade do pH ruminal, favorecendo assim bactérias anaeróbicas em geral e celulolíticas, como consequência melhora na degradação de fibras na dieta (Harrison *et al.*, 1988).

Os prebióticos são, em sua maioria, complexos de hidratos de carbono não digeríveis, que podem servir como fontes de nutrientes para a microbiota intestinal, esperando que favoreçam o crescimento de bactérias benéficas (Cuarón, 2006). Esses complexos são oligossacarídeos, sendo que os compostos mais utilizados são os mananoligossacarídeos, obtidos da parede externa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Saf do Brasil, 2007), e os frutoligossacarídeos que são encontrados em determinadas plantas (Roberfroid, 1996).

Os Prebióticos não são digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, mas seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrointestinal que podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou adicionados a ela por meio de fontes exógenas concentradas. (Gibson & Roberfroid, 1995; Roy e Gibson, 1998).

CAPÍTULO II

2.1 Resumo

INCLUSÃO DO SUBSTRATO DE PLEUROTUS OSTREATUS NA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO IN VITRO DO FENO DE BRAQUIÁRIA.

O cogumelo é um alimento apreciado no mundo inteiro e cada cultura criou sua própria forma de consumo. Segundo Wasser; Weis, 1999. possui cerca de 30% de proteína bruta, sais minerais, ferro, vitaminas B1 e B2, cálcio, fibras, outros elementos essenciais, além de baixo teor de gordura e carboidrato. O cogumelo é um alimento que atende as exigências alimento para o homem, pois em uma pequena área pode-se ter grandes produções, com produtividades médias de 18 a 20 Kg/ m²/ ano. O problema é que para produzir 80g de cogumelo in natura é necessário 100g substrato para crescimento do cogumelo propriamente dito, gerando uma quantidade de resíduo muito grande. O objetivo deste é estudar a inclusão do substrato de *Pleurotus ostreatus* na fermentação “in vitro” de dieta a base de feno de *Brachiária brizantha* para ruminantes, assim como determinar diferenças na produção de gás com diferentes níveis de inclusão. Avaliando a cinética de degradação “in vitro” de dietas à base de feno com diferentes níveis de inclusão de substrato exaurido da produção de *Pleurotus ostreatus*, além de quantificar a proteína degradada no rumem a partir do substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus*. O experimento pela técnica “in vitro” semi-automática de produção de gases foi realizado no Laboratório de Nutrição animal da Fazenda Água Limpa-Fal/UnB. Foram utilizados três bovinos adultos como doadores selecionou-se dois alimentos um padrão e um potencial alimento: O Feno (F) e Substrato Exaurido *Pleurotus ostreatus* (SE) em cinco diferentes tratamentos, 100% (F), como padrão de alimento; 100% (SE), para testar o potencial do material e avaliar a capacidade de inibição ou aumento de produção de gás; (F) + (SE) 5%; (F) + (SE) 20%; (F) + (SE) 30%.

O delineamento experimental foi umfatorial 5 X 3 com cinco tratamentos e 3 inóculos (três animaisdoadores). A análise de variância, foi feita pelo PROC GLM do programa estatística SAS (2000). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey (5%). A degradabilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) estimada segundo Theodorou et al. (1994), no tempo pré-determinado de 96 horas. As análise bromatológicas foram: MM, MS, PB, FDN, FDA, EE, FB segundo A.O.A.C. (1990) e VAN SOEST et al. (1991). Para produção total de gases obteve-se o tratamento (F)+(SE)5% a maior quantidade acumulada de gases com uma produção de 284,28 ml de gases ficando 8% acima do (F) 100%, reafirmando a condição de melhora na utilização do Feno pelos microorganismos ruminal. O substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* apresentou rápida colonização pelos microrganismos do rúmen, além de propiciar uma facilitação na degradação do feno. Os padrões de fermentação foram inferiores ao do feno estudado, mostrando que o resíduo não pode ser utilizado em substituição a um volumoso de boa qualidade, entretanto a inclusão do substrato ao feno não prejudicou a fermentação e poderia ser utilizada como uma alternativa de aproveitamento do resíduo em dietas de ruminantes.

Palavras-chaves: Brachiária brizantha, composição química, fibra, produtos “orgânicos”, tratamento biológico.

2.2 Abstract

Inclusion of substrate of *Pleurotus ostreatus* on kinetics of in vitro fermentation of *Brachiaria hay*

The mushroom is a food enjoyed throughout the world and each culture has created its own form of consumption. According to Wasser; Weis, 1999.it has about 30% crude protein, minerals, iron, vitamins B1 and B2, calcium, fiber, other essential elements, and low in fat and carbohydrate. The mushroom is a food that meets the demands food for man, because in a small area have major productions, a mean yield 18-20 kg / m² / year. The problem is that to produce 80g of fresh mushroom is necessary 100g substrate for growth of

the fungus itself, generating a huge amount of waste. The aim of this study is the inclusion of the substrate of *Pleurotus ostreatus* on fermentation in vitro of diet of *Brachiaria brizantha* hay for ruminants, as well as determining differences in gas production with different levels of inclusion. Assessing the degradation kinetics in vitro of diets based on hay with different levels of inclusion of substrate depleted production of *Pleurotus ostreatus*, and quantify the protein degraded in the rumen from the exhausted substrate of *Pleurotus ostreatus*. The experimental technique in vitro semi-automated gas production was conducted at the Laboratory of Animal Nutrition at Agua Limpa-Fal/UnB. Three adult cattle were used as donors was selected two foods a pattern and a potential food: The Hay (F) and substrate Exhausted *Pleurotus ostreatus* (SE) in five different treatments, 100% (F) as the standard of food, 100% (SE), to test the potential of the material and assess the ability of inhibition or increased gas production, (F) + (SE) 5% (F) + (SE) 20% (F) + (SE) 30%. The experiment was a 5 X 3 factorial with five treatments and three inocula (three animals doadores). The analysis of variance was performed by PROC GLM of SAS statistical program (2000). Means were compared by Tukey test (5%). The in vitro degradability of dry matter (DM) estimated according to Theodorou et al. (1994), the predetermined time of 96 hours. The chemical analysis were: MM, MS, CP, NDF, ADF, EE, CF by AOAC (1990) and VAN SOEST et al. (1991). For total gas production was obtained when the treatment (F) + (SE) 5% as much total gas with a production of 284.28 ml of gas going up 8% (F) 100%, reaffirming the status of improve the use of hay by rumen microorganisms. The exhausted substrate of *Pleurotus ostreatus* showed rapid colonization by microorganisms in the rumen, in addition to providing a facilitation in the degradation of hay. The patterns of fermentation were lower than hay studied, showing that the waste can not be used instead of a bulky good quality, however the inclusion of the substrate did not impair the hay fermentation and could be used as an alternative use of waste in diets of ruminants.

Key Words: biological treatment, *Brachiaria brizantha*, chemical composition, fiber, “organic” products.

2.3 INTRODUÇÃO

A produção do *Pleurotus ostreatus* gera um resíduo que atualmente é usado como matéria prima na produção de húmus em minhocários. Esse resíduo tem um grande potencial de uso na ração animal, pois após a colheita dos cogumelos descarta-se o substrato; Meio a base de feno *Brachiária brizantha* que foi colonizado por um fungo degradador de lignina, com isso, temos um alimento previamente digerido.

Com grande e contínuo crescimento populacional mundial estamos sempre procurando meios mais eficazes para produção de alimentos para a humanidade, dessa forma a uma necessidade de suplementação na agricultura e pecuária. Nessa última, uma das buscas ocorre em mecanismos, pré, pró ou simbióticos, que venham a melhorar a fermentação no rúmen e o crescimento da população microbiana do mesmo, favorecendo aumento entorno de 5 a 10% na produção, seja de leite e ou carne, podendo ocorrer benefícios secundários como exemplo: redução da acidose, coccidiose, timpanismo, abscesso de fígado e outros.

Dentre os mecanismos mais utilizados estão: Ionóforos; Leveduras; Antibióticos. Dentro dessa linha de raciocínio o substrato de *Pleurotus ostreatus* tem um grande potencial para ser inserido como um desses mecanismos, pois o micélio do *Pleurotus ostreatus* possui proteínas regulatórias que podem ajudar no processo e um alimento de fácil absorção devido à degradação prévia por parte do micélio fúngico.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1. Local

O experimento pela técnica “in vitro” semi-automática de produção de gases foi realizado no Laboratório de Nutrição animal da Fazenda Água Limpa-Fal de propriedade da Universidade de Brasília (UnB), em Junho de 2009.

O experimento pelo método “in situ” de degradabilidade da proteína foi realizado no Centro de manejo de bovinos da Fazenda Água Limpa-Fal, em Maio de 2009.

2.4.2. Animais doadores

Foram utilizados três bovinos adultos, machos castrado, mestiços, mantidos em dieta à base de silagem de milho, dois quilos de concentrado comercial contendo 20% de PB, sal mineral, pasto e água a vontade. Não houve adaptação dos animais à dieta.

2.4.3. Tratamentos

Selecionou-se um alimento padrão e um potencial alimento para ruminantes: Feno (F) e Substrato Exaurido *Pleurotus ostreatus* (SE) em cinco diferentes tratamentos, 100% (F), como padrão de alimento; 100% (SE), para testar o potencial do material e avaliar a capacidade de inibição ou aumento de produção de gás; (F) + (SE) 5%; (F) + (SE) 20%; (F) + (SE) 30%.

2.4.4. Ensaio da técnica “*in vitro*” semi-automática de produção de gases

O delineamento experimental foi um fatorial 5 X 3 com cinco tratamentos e 3 inóculos (três animais doadores).

Os tempos de medição dos gases foram os seguintes 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 26, 42, 48, 72, 96 horas.

A análise de variância, foi feita pelo PROC GLM do programa estatístico SAS (2000).

Utilizou-se o padrão de 1,0 grama de amostra, por frasco de 160ml, as porcentagens dos alimentos foram feitas com o peso seco, como mostra a tabela abaixo:

Tabela 02: Proporção dos alimentos utilizados em cada tratamento, feno (F) e substrato exaurido (SE).

Amostra	Quantidade	Amostra	Quantidade
(F)	1,0g	(SE)	0g
(F)	0g	(SE)	1,0g
(F)	0,95g	(SE)	0,05g
(F)	0,80g	(SE)	0,20g
(F)	0,70g	(SE)	0,30g

O material foi incubado em triplicata, em cada tempo havia dois brancos por inóculo, frascos contendo líquido ruminal e solução tampão, para correção da pressão produzida pelos alimentos



Figura. 05: Preparação da saliva artificial. Foto: Ricardo da Silva Oliveira

Com o auxílio de uma proveta adicionou-se 90 ml de solução tampão preparado conforme Theodorou et al. (1994). Vide tabela 03:

Tabela 03: Quantidade dos reagentes utilizados na solução de saliva artificial

Component (ml)	ml	Correção/1L	70
Água destilada	500	520,2 ml	13,4l
Tampão	200	208,1 ml	5,30l
Macromineral	200	208,1 ml	5,30l
Micromineral	0,1	0,1 ml	2,7ml
Solução rezarium	1	1,0 ml	26,9ml
Medio B	60	62,4 ml	16,1ml

Após o preenchimento com a solução tampão os frascos foram selados com tampas de silicone e guardos em geladeira, durante a noite. Pela manhã foram transferidos para estufa de 39°C, com o intuito de igualar à temperatura ruminal.



Figura.06: Estufa 39°C. Foto: Ricardo da Silva Oliveira

Os inóculos foram provenientes de três bovinos, o líquido foi retirado manualmente pela fístula, colocada nos animais, o transporte ocorreu em sacos plásticos sem furos, dentro de um isopor com água a 39°C.



Figura.07: Coleta de líquido Ruminal. Foto: Ricardo da Silva Oliveira

No laboratório utilizou-se um saco de algodão para a filtragem dos sólidos advindos do líquido ruminal, para manutenção da viabilidade da microbiota ruminal utilizou-se mangueiras de aquário e um cilindro de dióxido de carbono para injeção contínua de CO₂, mantido em banho-maria a 39°C. Em cada frasco 10ml do inóculo foi injetado mediante uso de uma seringa graduada. Logo após o preparo dos frascos foram tampados e uma agulha colocada na tampa de cada frasco por alguns segundos, para que eventuais gases injetados ou mesmo formados dentro do frasco fossem eliminados obtendo-se a pressão zero.

Em seguida, os frascos foram manualmente agitados e colocados em estufa a 39°C, formando com isso o tempo zero todas as garrafas com a mesma pressão. Em cada tempo, após a retirada do transdutor, a agulha foi mantida inserida de forma a igualar a pressão interna com a externa, esse procedimento durou alguns segundos. Ele foi repetido em todos os frascos e em todos os horários. Os frascos foram agitados, com movimentos circulares, antes de recolocá-los na estufa 39°C.

2.4.5. Ensaio de degradabilidade “*in vitro*” da matéria seca

Aproveitou-se o experimento da técnica “*in vitro*” semi-automática de produção gases, para analisar e correlacionar os dois experimentos, comparando a produção total de gases com o digestibilidade da matéria seca.

Ao final do período pré-determinado de 96 horas, após a medição da pressão no frasco um grupo previamente determinado foi removido da continuação e levados para geladeira (4°C) para cessar a atividade dos microorganismos. O material sólido e líquido de cada frasco foi filtrado em cadinhos de filtragem (porosidade 1) usando-se uma bomba de vácuo. A matéria seca degradada foi determinada pela secagem a 100°C, até obtenção de peso constante.

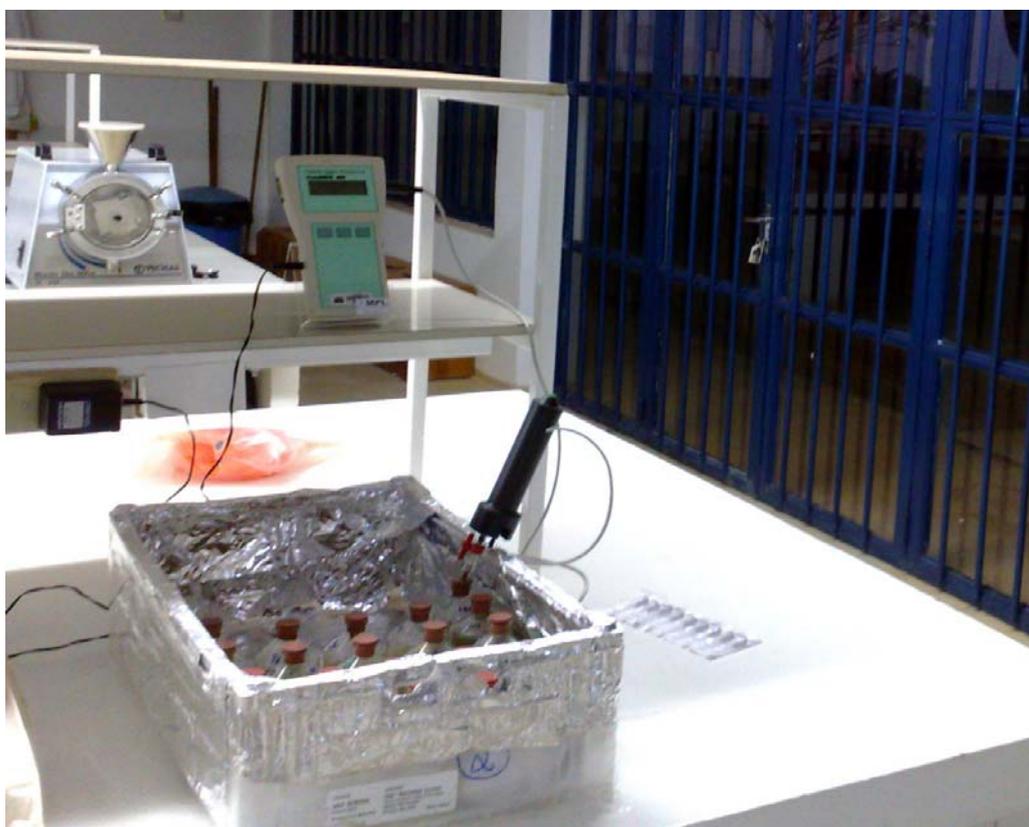


Figura 08: Medição de pressão com o transdutor. Foto: Ricardo da Silva Oliveira

A degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Foi analisada a partir de três frascos contendo o mesmo líquido ruminal, sendo três líquidos ruminais de três animais diferentes por tempo de DIVMS. Os frascos controle continham apenas líquido ruminal e a solução tampão. A DIVMS foi estimada segundo Theodorou et al. (1994). E no tempo pré-determinado 96 horas os frascos foram submetidos a um choque térmico com água fria para cessar a ação dos microorganismos sob o alimento e colocados no refrigerador horizontal e lá mantidos até filtração, em cadinhos específicos com porosidade 1, previamente pesados (Theodorou et al., 1994).

Os mesmos com o resíduo de incubação foram mantidos por 48 horas em estufa a 105°C e pesados.

2.4.6. Determinação da fração protéica degradada no rúmem “in situ”

Foram usados dois bovinos mestiços fitulados, cada um, contendo 16 sacos de náilon porosos não degradáveis, com cinco gramas de substrato exaurido *Pleurotus ostreatus* desidratados e moídos, em cada saco. Quatro sacos foram separados para medição da perda por lavagem (Wash Loss). Foi feita a análise de proteína bruta no período de 16 horas.

2.4.7. Análise bromatológicas

Foram realizadas as seguintes determinações de análise bromatológica: MM, MS, PB, FDN, FDA, EE, FB segundo A.O.A.C. (1990) e VAN SOEST et al. (1991). Valores descritos abaixo:

Tabela 4: Análise Bromatológica

Composição	(SE)	(F)
Matéria Mineral	12,9%	11,0%
Matéria seca	95%	80,6%
Proteína Bruta	8,2%	8,6%
FDN	65,75%	56%
FDA	47,77%	36%
Extrato Etéreo	1,64%	-
Fibra Bruta	22,54%	25%

(SE) = Substrato Exaurido de *Pleurotus ostreatus*; (F) = *Brachiária brizantha*.

2.4.8. Análise dos dados

Na produção de gases foram utilizados os dados de produção total de gases (acumulado) em 96h, nos parâmetros gerados pelo modelo de France et al. (1993):

$$V = V_f \times \left\{ 1 - e^{-a \left[-bx(t-t_0) - c \left(\sqrt{t-t_0} \right) \right]} \right\}$$

V= volume acumulado de gases, V_f = volume potencial, a e b = constantes do modelo e t_0 = tempo de iniciação da colonização dos microorganismos ruminal no alimento “lag fase” ou “lag Time”.

A pressão formada no interior dos frascos foi medida por intermédio da inserção de uma agulha acoplada ao transdutor de pressão à tampa de silicone e posteriormente transformada em volume, segundo equação desenvolvida por Guimarães et al. (2008), para as condições do Distrito Federal, onde:

$$V = 4,50231 \times P + 0,05164 \times P^2$$

V = Volume (mL); P = pressão (psi); P^2 = pressão ao quadrado ($R^2=0,996$).

Todos os dados foram análise por média aritmética, na qual se levou em consideração o valor final da produção de gases total.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento da técnica “*in vitro*” semi-automática de produção de gases (PG) observou-se uma grande diferença na produção de gases, entre os tratamentos do Feno 100% e do Substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* 100%.

O feno 100% apresentou uma fase de colonização maior com cerca de 7 horas e 16 minutos, para o início da colonização dos microorganismos (*lag phase*), fato este, explicado pela dificuldade no acesso aos nutrientes da célula vegetal.

O substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* apresentou sua fase de colonização em 2 horas e 59 minutos, demonstrando a degradação prévia imposta pelo fungo, na qual permitiu rápida colonização pelos microorganismos ruminal.

Com isso, obteve-se uma redução de 63,8% no tempo de colonização de materiais com composições semelhantes.

Nos tratamentos com inserção de 5, 20 e 30% de Substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* observa-se a atuação do mesmo, na diminuição no tempo de colonização, pois com a maior facilidade na absorção do alimento gerou-se uma maior quantidade de microorganismos e estes por sua vez conseguiram colonizar de forma mais eficiente a forragem, houve respectivamente uma diminuição de 18,15%, 4,18% e 7,68% no tempo de colonização de cada tratamento.

Na tabela abaixo se observa em números absolutos as porcentagens acima descritas.

Tabela 05. Parâmetros do modelo da cinética de fermentação e degradabilidade da matéria seca do feno e do substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus*, em diferentes proporções.

	Tratamentos					P<F	EPM
	Feno	Subst.	Feno + Subst. 5%	Feno + Subst. 20%	Feno + Subst. 30%		
A (mL)	262,57 ^a	165,94 ^b	284,28 ^a	256,57 ^a	261,68 ^a	<0,0001	21,02
b (%/h)	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,1806	0,01
C	-0,28	0,16	-0,28	-0,32	-0,27	<0,0001	0,04
L (h)	7,16	2,59	5,86	6,86	6,61	<0,0001	0,95
D (96 h)	60,08 ^a	52,11 ^b	58,43 ^a	58,30 ^a	58,07 ^a	<0,0001	0,05

Potencial de produção de gás (A), taxa de produção de gás (b), Ponto de interseção no eixo y (c), tempo de colonização (L), D (96h) degradabilidade da matéria seca.

a,b – médias seguidas de letras diferentes nas linhas, são diferentes pelo teste de Tukey com 95% de probabilidade.

Para produção total de gases o tratamento (F)+(SE)5% apresentou a maior quantidade acumulada de gases com uma produção de 284,28 ml de gases ficando 8% acima do (F) 100%, reafirmando a condição de melhora na utilização do Feno pelos microorganismos ruminal.

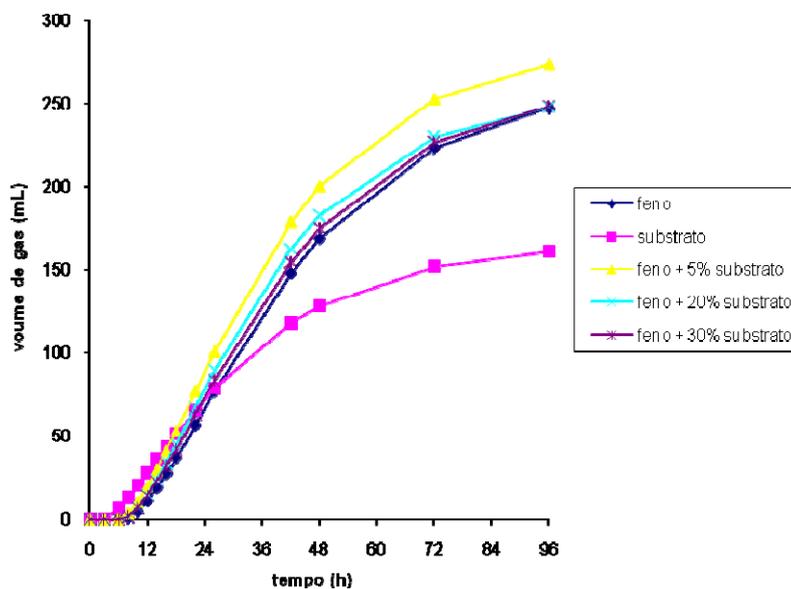


Figura 09: Curva de produção de gases dos tratamentos com o substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus*.

O gráfico, em análise, demonstra uma menor fase de colonização, para o substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* indicado pela rápida subida na produção em um curto espaço de tempo, apesar da produção total e o pico da produção ter sido menor.

Apesar da baixa produção de gases observada para esse tratamento, Nogueira et al. (2006), obteve valores de 186 ml para a cana-de-açúcar lavada em 96 horas de fermentação, semelhante aos encontrados para o resíduo do substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus*.

O feno apresentou uma curva menos acentuada do que o substrato 100%, devido à maior quantidade de fibras, mas levando em consideração todo o período da produção de gás, ao final das 96 horas, houve um acúmulo total maior do que o substrato. O substrato a 5% apresentou a maior produção de gás entre os tratamentos. O volume de gás produzido pelo feno no presente estudo foi semelhante ao encontrado por Nogueira et al. (2006), que obteve valores de 250 mL em 96 horas de fermentação para o feno de *Panicum maximum*.

O feno com inclusão de 5% de substrato foi o tratamento que obteve melhor resposta, pois conseguiu diminuir o tempo de colonização e aumentar a produção total de gases. Comparando a produção de gás deste ensaio com os resultados de Nogueira et al. (2006), podemos equiparar esse tratamento ao do concentrado 20%, no qual ele encontrou volume de gás de 296 mL. Faria et al. (2008), avaliando as silagem de milho, obteve menores volume de produção de gás do que todos os tratamentos com a inclusão do substrato (5, 20 e 30%) do presente estudo.

Com relação à produção potencial de gases (A) os valores obtidos para os diferentes níveis de inclusão e o feno, foram semelhantes. O substrato puro apresentou produção potencial inferior, demonstrando ser um alimento de menor qualidade nutricional que os outros tratamentos testados.

As diferenças observadas entre os tratamentos, podem-se dar pelo fato da forma como o fungo interage na parede celular, pois segundo Schmidt et al. (2002) a maior degradação do fungo foi na hemicelulose, não interagindo totalmente com a celulose e a lignina. Podemos inferir que o substrato possui uma energia mais bioabsorvível só que em menor quantidade.

Rajarithnam & Bano (1989) afirma que os basidiomicetos provocam degradação preferencial da lignina, em contradição com Schmidt et.al. (2003) que observou o aumento na concentração de lignina pela ação preferencial pela hemicelulose. Adamovic et al. (1998), também relatou maior afinidade do fungo pela lignina experimento este realizado com palha de trigo inoculada com *P. ostreatus*. Com diminuição de 4% de lignina, após 120 dias de incubação. Moyson & Verachtert (1991) relataram, após 84 dias de incubação com duas espécies do gênero *Pleurotus*, degradação de 59% da hemicelulose e 54% lignina e de 11% celulose.

No presente trabalho, por se tratar de um material advindo da produção de cogumelos, que passou um mês de colonização e três meses em produção, a ação do fungo sobre a fibra do feno proporcionou um melhor acesso dos microrganismos a frações da fibra de menor disponibilidade, com a lignina, diminuindo o tempo inicial de colonização. Entretanto, as frações mais fermentáveis como a hemicelulose e celulose foram aproveitadas pelo fungo, diminuindo o potencial de produção de gás do substrato.

2.6 CONCLUSÕES

O substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* apresentou rápida colonização pelos microrganismos do rúmen, além de propiciar uma facilitação na degradação do feno. Os padrões de fermentação foram inferiores ao do feno estudado, mostrando que o resíduo não pode ser utilizado em substituição a um volumoso de boa qualidade, entretanto a inclusão do substrato ao feno não prejudicou a fermentação e poderia ser utilizada como uma alternativa de aproveitamento do resíduo em dietas de ruminantes.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOVIC, M.; GRUBIC, G.; MILENKOVIC, I. et al. The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. **Animal Feed Science Technology**, v.71, p.357-362, 1998.
- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. Energy and protein requirements of ruminants; **Na advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients**. Wallingford: CAB International, 1993. 151 p. 71. 10.
- ANDRIGUETTO, J.M. et al. **Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal: os alimentos**. São Paulo: Nobel, 2002.
- ANUALPEC: **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Argos, 2006. 370p.
- ARENAS, S.E., L.S.L.S. REIS, N.M. FAZATTI-GALLINA, S.H. FUGIMURA, H. BREMEN-NETO, A.C. MESSAS AND P.E. PARDO. 2005. **Probiotic increases the humoral immune response in bovines immunized with the rabies vaccine**. In: XVI International Conference on Rabies in the Americas, 2005, Ottawa. Anais.Ottawa: Canadian Food Inspection Agency, p.99.
- BARBOUR, M. G., BURK, J. H., PITTS, W. D. 1987. **Terrestrial Plant Ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings. 634 p.
- BEESON, W.M.; PERRY, T.W.; REYNOLDS, P.J. The effect of surfactants on the growth rate of swine. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 12, p. 619-622,1953.

- BERGEN, W. G.; BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 58, p. 1465-1483, 1984.
- BERTO, D.A.; Levedura seca de destilarias de álcool de cana-de-açúcar (*Saccharomyces spp.*) na alimentação de leitões em recria. 1985. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.
- BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E.R. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting food intake in cattle. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.40, p.109-119, 1993.
- BUSWELL, J.A.; ODIER, E. Lignin biodegradation. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v.6, n.1, p.01-60, 1987.
- CAMPOS, V. Cogumelo: dividir para ganhar. **Guia Rural**, São Paulo, v. 4, n^o 2, p. 41-44, 1990.
- CHANG, S.T.& MILES, P.G. **A new look at cultivated mushrooms**. Bioscience, Waswington. V. 34, N^o 06. p.358-362, 1984.
- CHANG, S. T.; HILES, P. G. **The Nutritional Attributes and Medical Value of Edible Mushroom**. In: Edible Mushrooms and their cultivation. CCR Press. p. 27-40, 1989.
- CHANG, S.T. **Cultivated mushrooms in hand book of applied mycology**. Vol.3. Food and Feeds. Edited by Arora, D. et al. Marcel Dekker, Inc. New York. 1991. P.221-240.
- CHANG, S.T., MILES, P.G. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal efect, and environmental impact. **Boca Raon: CRC Press**, 2004, 451 p.
- COPPOLA, M.M. E C.G. TURNES. 2004. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, 34: 1297- 1303.

- CUARÓN J.A.C. Estímulo de la inmunidad por Pre y Probióticos. II CLANA, **Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal**, CBNA, 2006.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. et al. Níveis de proteína bruta em suplementos múltiplos para terminação de novilhos mestiços em pastejo durante a época seca: desempenho produtivo e características de carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.169-180, 2004.
- ERIKSSON, K. E., BLANCHETTE, R. A., ANDER, P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. **Berlin/New York: Springer-Verlag**. 407 p.
- ERTEL, J. R., HEDGES, J. I. 1985. Sources of sedimentary humic substances: Vascular plant debris. **Geochim. Cosmochim. Acta** 49:2097-107.
- FAO. Situacion de los mercados de productos basicos. 2006. Disponível em: **www.fao.org**. Acessado em: 20 mai. 2009.
- FARIA B.N., REIS R.B., MAURÍCIO R.M., LANA A.M.Q., SOARES S.R.V., SATURNINO H.M., COELHO S.G. Efeitos da adição de propilenoglicol ou monensina à silagem de milho sobre a cinética de degradação dos carboidratos e produção cumulativa de gases in vitro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.60, n.4, p.896-903, 2008.
- FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K. et al. A model to interpret gas accumulation profiles with in vitro degradation of ruminal feeds. **J. Teoret. Biol.**, v.163, p.99-111, 1993.
- GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S. et al. In vitro measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.72, p.261- 281, 1998.

- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, B.M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J Nutr**, v.125, p.1401-1412., 1995.
- GUIMARÃES, R. JR.; CABRAL, S. L. S. F.; FERNANDES F. D.; VILELA, L.; MARTHA, G. B. J. Relação entre Pressão e Volume para Implantação da Técnica “*in vitro*” Semiautomática de Produção de Gases na Embrapa Cerrados. **Comunicado Técnico 144**, Embrapa Cerrados. Brasília 2008.
- HARRISON, G.A.; HEMKEN, R.W.; DAWSON, K.A. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial population. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.71,n. 11, p. 2967-2975, 1988.
- JACOBI, P. et al. (orgs.). **Educação, meio ambiente e cidadania: reflexões e experiências**. São Paulo: SMA, 1998.
- KAMIDA, H. et al. Biodegradação de Efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, jul./ago. 2005.
- KENDRICK, B. The fifth kingdom: **Newburyport: Focus Information Group**, 1992. 406p.
- KERR, J., GORING, D. A. I. 1975. The ultrastructural arrangement of the wood cell wall. Cellulose. **Chem. Technol.** 9: 563-73.
- KIM, S. W.; HWANG, H. J.; PARK, J.P.; CHO, Y.J.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. Blackwell Synergy. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.34, n. 1, p. 56, 2002.
- KIRK, T. K. 1971. Effect of microorganisms on lignin. **Annu. Rev. Phytopathol.** 9:185-210.

- KIRK, T. K., FARRELL, R. L. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. **Annu. Rev. Microbiol.** 41:465-50.
- MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.79, p.321-330, 1999.
- MAURÍCIO, R.M.; PEREIRA, L.G.; GONÇALVES, L.C. et al. Obtenção da equação quadrática entre volume e pressão para implantação da técnica in vitro semi-automática de produção de gás para avaliação de forrageiras tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba, **Anais... Piracicaba: SBZ**, 2001. p.1340-1341.
- MELILLO, J. M., ABER, J. D., MURATORE, J. F. 1982. **Nitrogen and lignin control of hardwood leaf litter decomposition dynamics.** Ecology 63:621-26.
- MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. **J. Agric. Sci.**, v.93, p.217-222, 1979.
- MINSON, D.J. Forage in ruminant nutrition. **San Diego: Academic Press**, 1990. 483p.
- MIZUNO, T; ANDO, M; SUMIYA, T; MATSURA, A **bioscience, biotech and bioch.** 56(1):34-41, 1992.
- MOREIRA NETO, SÉRGIO L. **Enzimas Lignofílicas produzidas por Psilocybe castanella CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno.** 2006, 110f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

- MOTA, R.M., J.L.S. MOREIRA, M.R. SOUZA, M.F. HORTA, S.M.R. TEIXEIRA, E. NEUMANN, J.R. NICOLI AND A.C. NUNES. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. ***BMC Biotechnol.***, 6: 1-11. 2006
- MOULD, F. Predicting feed quality: chemical analysis and in vitro evaluation. ***Field Crops Res.***, v.84, p.31-44, 2003.
- MOYSON, E.; VERACHTERT, H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v.36, p.421-424, 1991.
- NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J.; CHEN, X.B. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. ***Journal of Animal Science***, Albany, v. 73, p. 1811-1818, 1995.
- NICODEMO, M. L. F. Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte. ***Embrapa Gado de corte***, 54p.2001.
- NOGUEIRA. U.T., MAURÍCIO. R.M., GONÇALVES L.C. Comparação de substratos com diferentes quantidades de carboidratos solúveis utilizando a técnica in vitro semi-automática de produção de gases. ***Revista Brasileira de Zootecnia***, v.58, n.4, p.633-641, 2006.
- OFFICIAL methods of analysis. 13.ed. Washington DC:AOAC, 1980. 1015p.
- ØRSKOV, E.R.; HOVELL, F.D.B.; MOULD, F. The use of the nylon bag technique for evaluation of feedstuffs. ***Tropical Animal Production***, v.5, p.195-213, 1980.
- RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Pleurotus mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. ***CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, v.28, n.1, p.31-113, 1989.

- RAYNER, A. D. M., BODDY, L. 1988. Fungal Decomposition of Wood. **Its Biology and Ecology**. New York: Wiley.587 p.
- ROBERFROID, M.B. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: Chicory fructooligosaccharides. **Nutr. Rev., Washington, DC.**, v.54, p.S38-S42, 1996.
- ROLLISON, J. D.; TAYLOR, F. G. R.; CHESNEY, J. Salinomycin poisoning in horses. **Veterinary Record**, v. 121, n 6, p. 126-128, 1987.
- ROY,M.; GIBSON,G.R. **Probiotics and Prebiotics - C-H-O Carbohydrates**, v. 9, n.3, p.6., 1998.
- RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX D.G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.
- SAF DO BRASIL, In: www.saf-agri.com/portuguese/mos.htm.
- SAMPAIO, C. B. Consumo, digestibilidade e dinâmica ruminal bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade suplementados com compostos nitrogenados. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007, 54p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - **Universidade Federal de Viçosa**, 2007.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, **Amsterdam**, v.8, p.341- 347, 1998.
- SARKANEN, K. V., LUDWIG, C. H. 1971. Lignins. Occurrence, Formation, Structure, and Reactions. **Wiley-Interscience:New York**. 916 p.

SAS/STAT Software:Syntax, Version 6, Cary, NC:SAS Institute Inc., 2000. 151p

SCHMIDT, P. Efeito da incubação com uréia ou inoculação com *Pleurotus ostreatus* no valor nutritivo do feno de braquiária. 2002. 83 f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2002.**

SCHMIDT, P. WECHSLER F. S., NASCIMENTO J.S. Tratamento do Feno de Braquiária pelo Fungo *Pleurotus ostreatus*. **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, p.1866-1871, 2003–
Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2003.

SNIFFEN, C.J.; BEVERLY, R.W.; MOONEY, C.S. *et al.* Nutrient requirements versus supply in the dairy cow: strategies to account for variability. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3160-3178, 1993.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. *et al.* A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.48, p.185-197, 1994.

TITTO, C.G. Comportamento de touros da raça simental à pasto com recurso de sombra e tolerância ao calor. 2006 54f. **Dissertação (mestrado) – Faculdade de zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.**

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.3583-3597, 1991.

WALLACE, R. J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of animal science**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 2992-3003, 1994.

WALDO, D.R.; SMITH, L.W.; COX, E.L. Model of cellulose disappearance from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.55, p.125-129, 1972.

- WASSER S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 60, p. 258-274, 2002.
- WOLIN, M.J. *A theoretical rumen fermentation balance*. **J. Dairy Sci.**, v.43, p.1452-1459, 1960.
- WU, J.S. The microbiologist`s function in developing action-specific microorganisms. In: LYONS, T.P., *Biotechnology in the feed industry*. **Nicholasville: Alltech Technical Publications, 1997**. p. 181-198.
- YOON, I.K.; STERN, M.D.; Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants: a review. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 8, p. 553-555,1995.
- ZADRAZIL, F. The conversion of straw into feed by Basidiomycetes. **European Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 4, p. 273-281, 1977.
- ZHANXI, L. & ZHANZHUA, L. Fungi cultivation with Jun-Cao. **Fuzhou: Asia-Pacific Cultivation Training Center**. 1995. 110 p.
- ZHANXI, L. ZHANHUA, L. **Cultivo de Cogumelos Comestíveis – 1º Curso Sobre Cultivo de Cogumelos Comestíveis Baseado na Técnica Chinesa**. CENARGEN-EMBRAPA, Brasília/DF. 1996. 95p. (Apostila traduzida).